

cells and normal cells and to reveal the tumor-specific alterations of O-glycan profiles.

Conclusion

We have developed an automatic system for releasing O-glycans from glycoproteins and applied the methods to the analysis of the released mucin-type glycans. In the current study, we developed methods for one-pot analysis of mucin-type glycans and GAGs. Serotonin affinity chromatography for group separation of mucin-type glycans based on the number of sialic acid residues [38] is also useful for collection of GAGs. As shown in Fig. 1, GAGs were strongly retained on the serotonin-immobilized column, and group separation of GAGs and mucin-type glycans was easily achieved. After collection of these glycans, mucin-type glycans were conveniently analyzed by MALDI-TOF MS and HPLC, and GAGs could be analyzed by CE as a mixture of unsaturated disaccharides after digestion with specific eliminases.

Two leukemia cancer cell lines (U937 and K562) showed similar profiles of mucin-type glycans and could not be discriminated only by comparing mucin-type glycans. However, GAG profiles showed obviously distinct characteristics (Fig. 7). In contrast, pancreatic cancer cell lines (PANC1 and BxPC3) showed similar GAG profiles but quite different mucin-type glycan profiles (Fig. 8). We also revealed that the profiles of GAGs as well as mucin-type glycans were dramatically altered at different differentiation stages of cancer cells, as determined by the analysis of MKN45 and MKN7 cells.

Based on these results, the current techniques will be useful to discover the novel biomarkers for diseases. However, the relationship between biological characteristics and O-glycan profiles observed in cancer cells might not be the same with that observed in actual physiological conditions. Therefore, to discover the practical glycan biomarkers for diagnosis of tumors, our method needs to be applied to the clinical samples such as serum or tissue samples. We are now applying the current methods to various kinds of biological samples. Furthermore, we are also developing methods for identification of proteins carrying specific glycans. These results will be shown in future publications.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.ab.2011.12.017.

References

- [1] S. Kamoda, M. Nakano, R. Ishikawa, S. Suzuki, K. Takehi, Rapid and sensitive screening of N-glycans as 9-fluorenylmethyl derivatives by high-performance liquid chromatography: a method which can recover free oligosaccharides after analysis, *J. Proteome Res.* 4 (2005) 146–152.
- [2] R. Naka, S. Kamoda, A. Ishizuka, M. Kinoshita, K. Takehi, Analysis of total N-glycans in cell membrane fractions of cancer cells using a combination of serotonin affinity chromatography and normal phase chromatography, *J. Proteome Res.* 5 (2006) 88–97.
- [3] S. Kamoda, R. Ishikawa, K. Takehi, Capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection for detailed studies on N-linked oligosaccharide profile of therapeutic recombinant monoclonal antibodies, *J. Chromatogr. A* 1133 (2006) 332–339.
- [4] K. Takehi, A. Susami, A. Taga, S. Suzuki, S. Honda, High-performance capillary electrophoresis of O-glycosidically linked sialic acid-containing oligosaccharides in glycoproteins as their alditol derivatives with low-wavelength UV monitoring, *J. Chromatogr. A* 680 (1994) 209–215.
- [5] B.L. Schulz, N.H. Packer, N.G. Karlsson, Small-scale analysis of O-linked oligosaccharides from glycoproteins and mucins separated by gel electrophoresis, *Anal. Chem.* 74 (2002) 6088–6097.
- [6] M. Backstrom, K.A. Thomsson, G.C. Hansson, Sensitive liquid chromatography-electrospray mass spectrometry allows for the analysis of the O-glycosylation of immunoprecipitated proteins from cells or tissues: application to MUC1 glycosylation in cancer, *J. Proteome Res.* 8 (2009) 538–545.
- [7] L. Royle, T.S. Mattu, E. Hart, J.I. Langridge, A.H. Merry, N. Murphy, D.J. Harvey, R.A. Dwek, P.M. Rudd, An analytical and structural database provides a strategy for sequencing O-glycans from microgram quantities of glycoproteins, *Anal. Biochem.* 304 (2002) 70–90.
- [8] Y. Huang, Y. Mechref, M.V. Novotny, Microscale nonreductive release of O-linked glycans for subsequent analysis through MALDI mass spectrometry and capillary electrophoresis, *Anal. Chem.* 73 (2001) 6063–6069.
- [9] K. Yamada, S. Hyodo, Y.K. Matsuno, M. Kinoshita, S.Z. Maruyama, Y.S. Osaka, E. Casal, Y.C. Lee, K. Takehi, Rapid and sensitive analysis of mucin-type glycans using an in-line flow glycan-releasing apparatus, *Anal. Biochem.* 371 (2007) 52–61.
- [10] K. Yamada, K. Takehi, Recent advances in the analysis of carbohydrates for biomedical use, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 55 (2011) 702–727.
- [11] K. Yamada, S. Hyodo, M. Kinoshita, T. Hayakawa, K. Takehi, Hyphenated technique for releasing and MALDI MS analysis of O-glycans in mucin-type glycoprotein samples, *Anal. Chem.* 82 (2010) 7436–7443.
- [12] Y.K. Matsuno, K. Yamada, A. Tanabe, M. Kinoshita, S.Z. Maruyama, Y.S. Osaka, T. Masuko, K. Takehi, Development of an apparatus for rapid release of oligosaccharides at the glycosaminoglycan–protein linkage region in chondroitin sulfate-type proteoglycans, *Anal. Biochem.* 362 (2007) 245–257.
- [13] R.S. Aquino, E.S. Lee, P.W. Park, Diverse functions of glycosaminoglycans in infectious diseases, *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* 93 (2010) 373–394.
- [14] S. Mizuguchi, T. Uyama, H. Kitagawa, K.H. Nomura, K. Dejima, K. Gengyo-Ando, S. Mitani, K. Sugahara, K. Nomura, Chondroitin proteoglycans are involved in cell division of *Caenorhabditis elegans*, *Nature* 423 (2003) 443–448.
- [15] A. Guzman-Aranguez, P. Argueso, Structure and biological roles of mucin-type O-glycans at the ocular surface, *Ocul. Surf.* 8 (2010) 8–17.
- [16] N.L. Perillo, K.E. Pace, J.J. Seilhamer, L.G. Baum, Apoptosis of T cells mediated by galectin-1, *Nature* 378 (1995) 736–739.
- [17] S.J. Storr, L. Royle, C.J. Chapman, U.M. Hamid, J.F. Robertson, A. Murray, R.A. Dwek, P.M. Rudd, The O-linked glycosylation of secretory/shed MUC1 from an advanced breast cancer patient's serum, *Glycobiology* 18 (2008) 456–462.
- [18] P.H. Jensen, D. Kolarich, N.H. Packer, Mucin-type O-glycosylation – putting the pieces together, *FEBS J.* 277 (2010) 81–94.
- [19] Y. Mechref, M.V. Novotny, Structural investigations of glycoconjugates at high sensitivity, *Chem. Rev.* 102 (2002) 321–369.
- [20] H.J. An, S.R. Kronewitter, M.L. de Leoz, C.B. Lebrilla, Glycomics and disease markers, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 13 (2009) 601–607.
- [21] S.H. Lee, M. Fukuda, Core 3 glycan as tumor suppressor, *Methods Enzymol.* 479 (2010) 143–154.
- [22] T. Iwai, T. Kudo, R. Kawamoto, T. Kubota, A. Togayachi, T. Hiruma, T. Okada, T. Kawamoto, K. Morozumi, H. Narimatsu, Core 3 synthase is down-regulated in colon carcinoma and profoundly suppresses the metastatic potential of carcinoma cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102 (2005) 4572–4577.
- [23] I. Brockhausen, Pathways of O-glycan biosynthesis in cancer cells, *Biochim. Biophys. Acta* 1473 (1999) 67–95.
- [24] I. Brockhausen, Sulphotransferases acting on mucin-type oligosaccharides, *Biochem. Soc. Trans.* 31 (2003) 318–325.
- [25] I. Brockhausen, Glycodynamics of mucin biosynthesis in gastrointestinal tumor cells, *Adv. Exp. Med. Biol.* 535 (2003) 163–188.
- [26] G.F. Springer, T and Tn, general carcinoma autoantigens, *Science* 224 (1984) 1198–1206.
- [27] S. Nakamori, M. Kameyama, S. Imaoka, H. Furukawa, O. Ishikawa, Y. Sasaki, T. Kabuto, T. Iwanaga, Y. Matsushita, T. Irimura, Increased expression of sialyl Lewis^x antigen correlates with poor survival in patients with colorectal carcinoma: clinicopathological and immunohistochemical study, *Cancer Res.* 53 (1993) 3632–3637.
- [28] C. Hanski, E. Klussmann, J. Wang, C. Bohm, D. Ogorek, M.L. Hanski, S. Kruger-Krasagakes, J. Eberle, A. Schmitt-Graff, E.O. Riecken, Fucosyltransferase III and sialyl-Le^x expression correlate in cultured colon carcinoma cells but not in colon carcinoma tissue, *Glycoconj. J.* 13 (1996) 727–733.
- [29] N. Kojima, K. Handa, W. Newman, S. Hakomori, Inhibition of selectin-dependent tumor cell adhesion to endothelial cells and platelets by blocking O-glycosylation of these cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 182 (1992) 1288–1295.
- [30] Y.H. Teng, P.H. Tan, S.J. Chia, N.A. Zam, W.K. Lau, C.W. Cheng, B.H. Bay, G.W. Yip, Increased expression of non-sulfated chondroitin correlates with adverse clinicopathological parameters in prostate cancer, *Mod. Pathol.* 21 (2008) 893–901.
- [31] H. Nakanishi, K. Oguri, K. Yoshida, N. Itano, K. Takenaga, T. Kazama, A. Yoshida, M. Okayama, Structural differences between heparan sulphates of proteoglycan involved in the formation of basement membranes in vivo by Lewis-lung-carcinoma-derived cloned cells with different metastatic potentials, *Biochem. J.* 288 (1992) 215–224.
- [32] K. Raman, B. Kuberan, Chemical tumor biology of heparan sulfate proteoglycans, *Curr. Chem. Biol.* 4 (2010) 20–31.
- [33] R.D. Sanderson, Y. Yang, T. Kelly, V. MacLeod, Y. Dai, A. Theus, Enzymatic remodeling of heparan sulfate proteoglycans within the tumor microenvironment: Growth regulation and the prospect of new cancer therapies, *J. Cell. Biochem.* 96 (2005) 897–905.
- [34] R. Sasisekharan, S. Ernst, G. Venkataraman, On the regulation of fibroblast growth factor activity by heparin-like glycosaminoglycans, *Angiogenesis* 1 (1997) 45–54.
- [35] A.D. Theocharis, M.E. Tsara, N. Papageorgacopoulou, D.D. Karavias, D.A. Theocharis, Pancreatic carcinoma is characterized by elevated content of

- hyaluronan and chondroitin sulfate with altered disaccharide composition, *Biochim. Biophys. Acta* 1502 (2000) 201–206.
- [36] H. Morohashi, A. Kon, M. Nakai, M. Yamaguchi, I. Kakizaki, S. Yoshihara, M. Sasaki, K. Takagaki, Study of hyaluronan synthase inhibitor, 4-methylumbelliferone derivatives, on human pancreatic cancer cell (KP1-NL), *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 345 (2006) 1454–1459.
- [37] F.J. Vizoso, J.M. del Casar, M.D. Corte, I. Garcia, M.G. Corte, A. Alvarez, J.L. Garcia-Muniz, Significance of cytosolic hyaluronan levels in gastric cancer, *Eur. J. Surg. Oncol.* 30 (2004) 318–324.
- [38] K. Yamada, M. Kinoshita, T. Hayakawa, S. Nakaya, K. Takehi, Comparative studies on the structural features of O-glycans between leukemia and epithelial cell lines, *J. Proteome Res.* 8 (2009) 521–537.
- [39] A. Ishizuka, Y. Hashimoto, R. Naka, M. Kinoshita, K. Takehi, J. Seino, Y. Funakoshi, T. Suzuki, A. Kameyama, H. Narimatsu, Accumulation of free complex-type N-glycans in MKN7 and MKN45 stomach cancer cells, *Biochem. J.* 413 (2008) 227–237.
- [40] A. Seko, K. Nagata, S. Yonezawa, K. Yamashita, Ectopic expression of a GlcNAc 6-O-sulfotransferase, GlcNAc6ST-2, in colonic mucinous adenocarcinoma, *Glycobiology* 12 (2002) 379–388.
- [41] N.P. Castro, C.A. Osorio, C. Torres, E.P. Bastos, M. Mourao-Neto, F.A. Soares, H.P. Brentani, D.M. Carraro, Evidence that molecular changes in cells occur before morphological alterations during the progression of breast ductal carcinoma, *Breast Cancer Res.* 10 (2008) R87.
- [42] J.P. Lai, D.S. Sandhu, C. Yu, T. Han, C.D. Moser, K.K. Jackson, R.B. Guerrero, I. Aderca, H. Isomoto, M.M. Garrity-Park, H. Zou, A.M. Shire, D.M. Nagorney, S.O. Sanderson, A.A. Adjei, J.S. Lee, S.S. Thorgeirsson, L.R. Roberts, Sulfatase 2 up-regulates glypican 3, promotes fibroblast growth factor signaling, and decreases survival in hepatocellular carcinoma, *Hepatology* 47 (2008) 1211–1222.
- [43] Y. Kudo, I. Ogawa, S. Kitajima, M. Kitagawa, H. Kawai, P.M. Gaffney, M. Miyauchi, T. Takata, Periostin promotes invasion and anchorage-independent growth in the metastatic process of head and neck cancer, *Cancer Res.* 66 (2006) 6928–6935.
- [44] H. Lemjabbar-Alaoui, A. van Zante, M.S. Singer, Q. Xue, Y.Q. Wang, D. Tsay, B. He, D.M. Jablons, S.D. Rosen, Sulf-2, a heparan sulfate endosulfatase, promotes human lung carcinogenesis, *Oncogene* 29 (2010) 635–646.
- [45] P.V. Beum, J. Singh, M. Burdick, M.A. Hollingsworth, P.W. Cheng, Expression of core 2 β -1,6-N-acetylglucosaminyltransferase in a human pancreatic cancer cell line results in altered expression of MUC1 tumor-associated epitopes, *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 24641–24648.
- [46] L. Mare, M. Trinchera, Suppression of β -1,3-galactosyltransferase β -3Gal-T5 in cancer cells reduces sialyl-Lewis^x and enhances poly-N-acetyllactosamines and sialyl-Lewis^x on O-glycans, *Eur. J. Biochem.* 271 (2004) 186–194.
- [47] C. Pellizzaro, A. Speranza, S. Zorzet, I. Crucil, G. Sava, I. Scarlata, S. Cantoni, M. Fedeli, D. Coradini, Inhibition of human pancreatic cell line MIA PaCa2 proliferation by HA-But, a hyaluronic butyric ester: a preliminary report, *Pancreas* 36 (2008) e15–e23.

ヒトiPS(様)細胞加工医薬品等の 品質および安全性の確保に関する2つの指針案

Draft guidelines on ensuring quality and safety of products derived from engineered human (autologous/ allogenic) induced pluripotent stem cells



早川 堯夫

Takao HAYAKAWA

近畿大学薬学総合研究所

◎わが国発の技術開発であるiPS細胞を素材とした製品の再生医療における実用化が待望されている。わが国では業としての実用化・普遍化へのゴールゲートは薬事承認である。ゴールに向けての必要な要件を開発早期から示すことは、医学研究者や企業が研究・開発を合理的、効率的、効果的に進め、より迅速に実用化するために必須である。また、規制側としても、近い将来に予想される製品の評価を円滑に進めるための準備を早期に行う必要がある。さらに、国際競争面でも研究・技術開発のみならずガイドライン策定において先行することは、国際的優位性を保持するうえでも不可欠な要素である。最近、厚生労働科学研究班により、自己および同種由来のヒトiPS(様)細胞加工医薬品等の品質および安全性の確保に関する2つの指針案が作成された。指針案作成の背景および内容について概説する。めざすは患者益・国民益に資し、実用化の水先案内、牽引力・推進力としての役割である。



Key Word : ヒトiPS(様)細胞, 細胞加工医薬品等, 細胞バンク, 品質・安全性確保, 指針

再生医療はヒトの臓器や組織の確保が難しいわが国の医療状況下において強く期待されており、研究の進歩に伴う技術的な実現可能性の高まりとともに、医療としての実用化を望む声が増えつつ強くなっている。そのため、わが国をあげて再生医療の実用化に向けた動きが急速に進められている。再生医療の手法としてもっとも一般的なものは、細胞・組織を加工して医薬品・医療用具として適用する方法である。こうした製品の実用化のために必要な要件を開発早期から示すことは、医学研究者や企業が研究・開発を合理的、効率的、効果的に進め、より迅速に実用化するために必須である。また、規制側としても、予想される製品の評価を研究・開発関係者等と認識を共有しながら円滑に進めるために必要である。そこで、厚生労働省は2006年から厚生労働科学研究班(班長: 早川堯夫)による検討を行った。その結果、2008

年2月および9月にそれぞれ自己および細胞・組織加工医薬品等全般に関する指針『ヒト(自己)由来細胞・組織加工医薬品等の品質及び安全性の確保に関する指針(薬食発第0208003号)』(以下、“自己親指針”と称する)および『ヒト(同種)由来細胞・組織加工医薬品等の品質及び安全性の確保に関する指針(薬食発第0912006号)』(以下、“同種親指針”と称する)を通知として発出するに至った。

その間、とくにヒト由来の多能性細胞、すなわち間葉系幹細胞などの体性幹細胞、胚性幹細胞(ES細胞)が細胞・組織加工医薬品等の重要な素材として研究対象となってきた。さらに山中らはヒト人工多能性幹細胞(ヒトiPS細胞)の作製に成功し、分化した細胞を人為的にリプログラミング(初期化)できることを示した。これは細胞の分化・脱分化が人為的に自在に操作できる可能性を

示唆する金字塔であり、その活用により生命現象解明のための基礎研究、病因や発症機構解明などの医学研究、毒性・薬効評価系確立などを通じた創薬研究、さらに再生医療の実用化にも無限の可能性が拓かれた。こうしてiPS細胞が細胞・組織を加工医薬品等の素材としてきわめて大きな脚光を浴びることになった。

こうした状況下で、わが国発の技術開発であるiPS細胞をはじめ、各種幹細胞に由来する製品の薬事法下での臨床応用に向けて、研究・開発、品質・安全性の観点からヒトに適用してもさしつかえないかの評価にかかわる確認(First-in-Man；治験開始の前提条件を充たしているかの評価・確認)などを効率的、効果的、合理的に行ううえで必要と思われる技術、製造方法、特性解析方法、品質管理方法および安定性、ならびに非臨床安全性および有効性に関する留意事項およびデータに関する指針の作成が強く要望された。

これに対応するため平成20年度(2008)から厚生労働科学研究事業「ヒト幹細胞を用いた細胞・組織加工医薬品等の品質・安全性確保に関する研究班」(班長：早川堯夫)が実施された。研究では、ヒト幹細胞の細胞・組織加工医薬品等への利用に関連した学問・技術の進歩、倫理上の重要ポイント、各種規制、国際動向などを調査・研究し、適切な安全性評価基準の作成や規制のあり方を検討することにより、ヒト幹細胞由来製品の実用化の推進を図ることを目的とした。

その結果、“自己親指針”をベースとして、ヒト(自己)体性幹細胞およびヒト(自己)iPS(様)細胞加工医薬品等に関するそれぞれの指針案(中間報告)を作成した。また、“同種親指針”をベースとして、ヒト(同種)体性幹細胞、ヒトES細胞、ヒト(同種)iPS(様)細胞に関するそれぞれの指針案(中間報告)を作成し、公表した¹⁾。これをベースにさらに諸外国での状況、その後の当該分野の進歩、さまざまな観点からの論議を踏まえて最終案(以下、本指針案と略する)を作成した²⁾。

本稿では、自己および同種由来ヒトiPS(様)細胞を加工した医薬品または医療機器の品質および安全性の確保のための基本的な技術要件に関する指針案について紹介する。

ヒトiPS(様)細胞加工医薬品等の作成にあたっての基本的考え方

本指針案を作成するにあたっては、以下のようなiPS細胞の特徴や関連する事項を考慮し、ベースとなった自己親指針(薬食発第0208003号)および同種親指針(薬食発第0912006号)に付加する形で盛り込むことにした。

1. 再生医療の素材としてのヒトiPS(様)細胞

いうまでもなく再生医療の究極の目的は治療である。したがって、つねに治療(目的)から発想する考え方・アプローチが肝要であり、どのような疾患を対象に、どのような製品を開発するかが第一義的課題である。iPS細胞の作製による細胞の分化・脱分化に関するパラダイムシフトは、再生医療への応用に無限の可能性(手段)を提供するが、このことは、初期化の程度や特定iPS細胞の標準化がすべての再生医療への応用の前提であるということをかみならずも意味するわけではない。初期化の程度を一定にすることができ、iPS細胞の標準化ができることは、再生医療に利用される細胞・組織加工医薬品等の創製のための特性が明らかでない原材料、すなわち重要な素材(手段)のひとつの提供という大きな意義をもつ。しかし、すべての製品のもとが特定のiPS細胞でなければならないという必然性はない。ある個別の製品に対して素材として適切な細胞があれば、それでよい。重要なことは、細胞の分化・脱分化が人為的に操作できるというパラダイムのなかで、ある特定の治療(目的)にかなう品質、有効性、安全性を有する最終製品を製造するのに適切な素材として人工的に誘導された多能性の細胞が適切に位置づけられることである。どの細胞から、どの手段で、どの程度初期化(多能性化)した細胞を得て、どのような分化誘導で、どのような細胞を経て目的細胞に至るかが、各開発研究関係者の挑戦課題であると思われる。

以上のような趣旨のもと、本指針では“ヒトiPS細胞”に加え、“ヒトiPS様細胞”を視野においた記述を含めることとし、それぞれの細胞を暫定的につぎのように定義した。“ヒトiPS細胞”とは、「ヒト体細胞を遺伝子導入・蛋白質導入・薬剤処理等により人為的に初期化して得られる細胞又は当

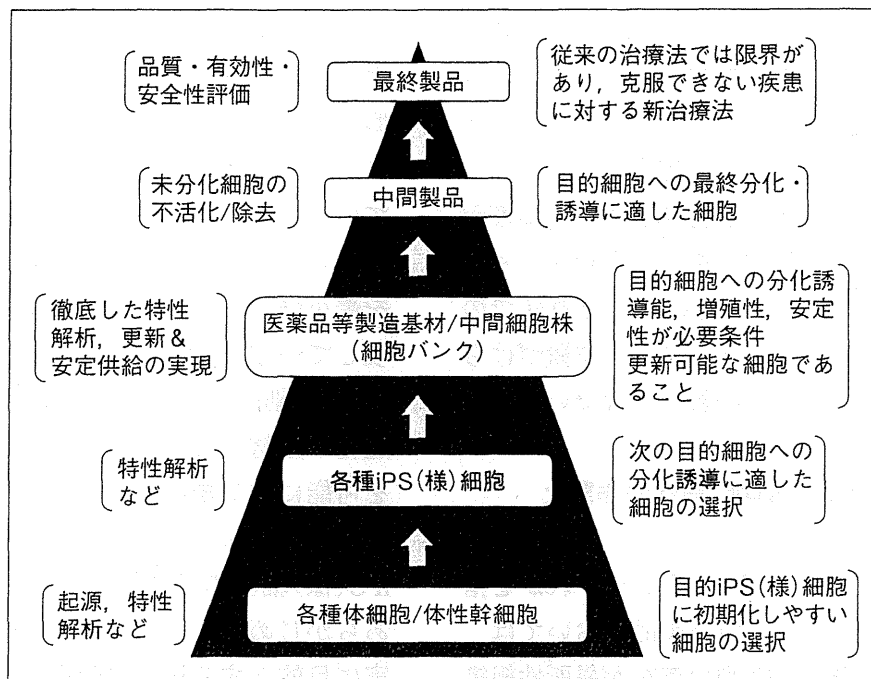


図 1 細胞バンクはヒトiPS細胞加工医薬品等製造のベースキャンプ

該細胞の分裂により生じる細胞であって、内胚葉、中胚葉及び外胚葉の細胞に分化する性質を有し、かつ、自己複製能力を維持しているもの又はそれに類する能力を有することが推定されるもの」をいう。また、“ヒトiPS様細胞”とは、「ヒト体細胞を遺伝子導入・蛋白質導入・薬剤処理等により人為的に脱分化して得られる細胞又は当該細胞の分裂により生じる細胞であって、少なくとも内胚葉、中胚葉または外胚葉の一部の細胞に分化する性質を有し、自己複製能を維持しているもの又はそれに類する能力を有することが推定されるもの」を指す。

2. iPS(様)細胞と医薬品製造基材/中間細胞株

生物起源の医薬品等(バイオロジクス)は原材料において非特定起源からの由来や複雑さのために品質特性解析および管理がかならずしも必要十分にはなしえず、最終製品においても量的制約や複雑な品質特性のために、必要十分な分析・管理ができないことが多い。それらを補完するうえで、あらゆるバイオロジクスに通底するもっとも重要な概念および方策は、製造工程の一定性・恒常性を確保するということである。その中核をなすもっとも重要な要素は、全工程のある段階においてもっとも徹底した品質特性解析および管理が可能で、つぎの段階へのステップをつねに確実に

つ安定して進行させ、ゴールとしての最終製品に向かうことを可能にするベースキャンプたる“医薬品等製造基材/中間細胞株”である。“医薬品等製造基材”は一般に製品製造の出発原料たる“細胞バンク”として樹立され、管理される。中間細胞株がバンクとして利用されることもある(図1)。

細胞・組織加工医薬品等の安定的な製品製造におけるもっとも理想的なベースキャンプは、十分に解析され、安定で増殖性を有し、更新も安定供給も可能で、かつ目的細胞に適切に分化できる細胞(バンク)や中間細胞株である。製品によっては、原材料段階での困難な検討や解析結果にウェイトをおくよりも、いわば製造工程途上にある細胞株(中間細胞株：バンク)を適切に確実に樹立することが、安全な最終目的製品を安定的に製造するうえで重要であり、むしろ科学的にも合理的な場合がある。そのような方策を選択した場合は、その利点と妥当性を説明しておく必要がある。その際、別の表現型を示す細胞株を段階的に樹立する際は、それぞれの細胞株樹立までの方法(分化誘導方法、目的とする細胞の分離・培養および株化の方法、細胞株樹立までの各段階での培地、培養条件、培養期間および収率など)を明確にし、可能な範囲でその妥当性を明らかにする必要がある。このような中間細胞株の品質の均質性および

安定性を保持するため、各種細胞特性指標(細胞純度、形態学的評価、表現型特異的マーカー、核型、細胞増殖特性、分化能など)のうちから重要特性指標を同定してその基準を設定するとともに、設定された基準による品質を維持したまま増殖が可能な継代数または分裂回数を示す必要がある。

iPS(様)細胞そのものが上記のような意味での安定的な“医薬品製造基材/バンク”と位置づけられることは、かならずしも一般的ではないかもしれない。

3. より安全なヒトiPS(様)細胞の作製とその限界

iPS細胞またはiPS様細胞(以下、いずれかを指して“iPS(様)細胞”という)由来製品においては、最終製品における未分化細胞の存在が異所性組織形成や腫瘍形成・癌化の可能性など安全性上の重要な関心事である。これは元来iPS細胞の最大の特徴の裏返しであり、iPS細胞のレベルでこれに対策を講じることは、きわめて困難であると考えられる。iPS細胞を作製するために用いる誘導剤の改良などにより、安全性上懸念される外因的な要因を取り除くことで“より安全なiPS細胞”を作製することは可能であり、望ましいことと考えられる。しかし、iPS細胞を特徴づける固有の内因性の要素を取り除くことは原理的に二律背反であり、困難である。

また、“外因性因子の改良により樹立されたより安全なiPS細胞”は改良前のものに比較して“より安全な最終製品の発原材料”にはなりうるが、テラトーマ形成にアイデンティティがあるような内因性の固有の特性によるものに関しては、“より安全なiPS細胞”そのものが存在しないのではないかと考えられる。したがって、将来的にはiPS細胞レベルでの安全性を主題にするのではなく、製品からみた対策、すなわちある製品によってはiPS細胞そのものよりも、iPS細胞がもつ特性の必要部分を取り出したような“iPS様細胞”を原材料にしたり、製造工程や工程管理を工夫することにより、より安全性の高い最終製品を創出する戦略や戦術が大きな意味をもってくるのではないかと考えられる。それゆえ、本指針案では可能なかぎりセルバンクや中間製品段階などでの徹底

的な解析により、目的外の未分化細胞混在の可能性を否定するか、あるいは目的細胞から未分化細胞の効果的分離・除去法や不活化法の開発・適用により、混在の可能性を最小限にする努力を求めている。

さらに、投与経路などの選択も安全性上の懸念を最小限にするための有用な方策であることも示唆している。適切な体性幹細胞からiPS(様)細胞、iPS(様)細胞からより安全・安定、特性が明確で、適切な原材料となりうる任意の体性幹細胞の作製を可能にする技術や品質・特性解析技術の開発研究の重要性にも言及している。個々の細胞由来iPS(様)細胞の多能性や分化できる細胞の種類をあらかじめ見極める“検査技術”や、効率よく確実に目的とする細胞に分化誘導したり、分化細胞を未分化細胞から分離する“加工技術”の研究開発は、あらたなビジネスチャンスを生むことになると考えられる。

「ヒト(自己・同種)iPS(様)細胞加工医薬品等の品質及び安全性の確保に関する指針案」の概略

今回の指針案は2つある。自己由来のヒトiPS細胞を加工した製品と同種由来のヒトiPS細胞を加工した製品に対するものである。両者には相違点もあるが、共通項も多い。全体の構成(目次)は同じである。両指針案には、はじめに以下に示すような趣旨が述べられ、ついで表1に示すような本文が記載されている。以下にその概略および必要な解説をする。

1. 指針案の趣旨

両指針案の趣旨は基本的に共通である。以下に列記する。

(1) 本指針は、ヒト自己または同種由来の人工多能性幹細胞(iPS細胞)または人工多能性幹細胞様細胞(iPS様細胞)を加工した医薬品または医療機器(以下“ヒト(自己・同種)iPS(様)細胞加工医薬品等”または“ヒトiPS(様)細胞加工医薬品等”)という)の品質および安全性の確保のための基本的な技術要件について定めるものである。

しかし、ヒトiPS(様)細胞加工医薬品等は、ヒト体細胞より人為的に作製された各種iPS(様)細

表 1 ヒト(自己・同種)iPS(様)細胞加工医薬品などの品質および安全性の確保に関する指針(案)目次

第1章	総則
第1	目的
第2	定義
第2章	製造方法
第1	原材料及び製造関連物質
1	原材料となるヒト体細胞
2	目的とする細胞・組織以外の原材料及び製造関連物質
第2	製造工程
1	ロット構成の有無とロットの規定
2	製造方法
3	最終製品の構成要素となる細胞の特性解析
4	最終製品の形態、包装
5	製造方法の恒常性
6	製造方法の変更
第3	最終製品の品質管理
1	総論
2	最終製品の品質管理法
第3章	ヒト iPS(様)細胞加工医薬品等の安定性
第4章	ヒト iPS(様)細胞加工医薬品等の非臨床安全性試験
第5章	ヒト iPS(様)細胞加工医薬品等の効力又は性能を裏付ける試験
第6章	ヒト iPS(様)細胞加工医薬品等の体内動態
第7章	臨床試験

胞を人為的に分化誘導し、得られた特定の細胞をそのまま利用、あるいはさらに加工することにより製造されるため、その製造方法、中間製品や目的細胞の種類および特性、臨床上の適用法は多種多様であり、また、本分野における科学的進歩や経験の蓄積は日進月歩である。本指針を一律に適用したり、本指針の内容が必要事項すべてを包含しているとみなしたりすることがかならずしも適切でない場合もある。したがって、個々の医薬品等についての試験の実施や評価に際しては本指針の目的を踏まえ、その時点の学問の進歩を反映した合理的根拠に基づき、ケースバイケースで柔軟に対応することが必要である。

(2) 薬事戦略相談あるいは治験相談におけるヒト iPS(様)細胞加工医薬品等の治験を開始する(First-in-Man)にあたっての基本的留意点は、当該製品にヒトへの適用により支障となる品質および安全性上の明らかな問題が存在するかどうか、臨床で得られた知見との関係性を照合できる程度に品質特性が把握され、その一定範囲の恒常性が確保されているかどうかを確認することにある。

表 2 自己由来細胞製品と同種由来細胞製品における技術要件の相異点

<p>原材料となるヒト細胞の特性と適格性(同種)</p> <ul style="list-style-type: none"> ・免疫適合性(HLA タイピング)等の考慮 ・より厳密なドナーの選択基準、適格性の明確化と妥当性 <p>最終製品のウイルス試験</p> <ul style="list-style-type: none"> ・HBV, HCV, HIV, HTLVにつき、患者の段階で否定し得ず、かつこれらのウイルスを増殖させる可能性のある細胞の場合には、存在量に関する試験を実施し、製品の投与が患者の不利益にならないことを確認する必要(自己) ・製造工程中で生物由来成分を使用する場合、最終製品で当該成分由来のウイルス否定試験の実施を考慮すべき場合もある。しかし可能な限り、もとの成分段階での試験やプロセス評価で迷入が否定されていることが望ましい(自己・同種)
--

その際、明らかに想定される製品のリスクを現在の学問・技術を駆使して排除し、その科学的妥当性を明らかにしたうえで、なお残る“未知のリスク”と、重篤で生命を脅かす疾患、身体の機能を著しく損なう疾患、身体の機能や形態を一定程度損なうことにより QOL を著しく損なう疾患などに罹患し、従来の治療法では限界があり、克服できない“患者があらたな治療機会を失うことにより被るかもしれないリスク”とのリスクの大小を勘案し、かつ、これらすべての情報を開示したうえで患者の自己決定権に委ねるという視点をもつことも重要である。したがって、製品をはじめてヒトに適用する First-in-Man の場合、その申請にあたって添付すべき資料については本指針に示された要件や内容をすべて充たすことをかならずしも求めているわけではない。製造販売承認申請時における品質および安全性の確保のための資料は治験の進行とともに本指針に沿って充実整備されることを前提に、治験開始(First-in-Man)時点でその趣旨に合う条件を充たし、合理的に作成された適切な資料を提出すること。また、治験開始(First-in-Man)に必要とされる資料の範囲および程度については、当該製品の由来、対象疾患、対象患者、適用部位、適用方法および加工方法などにより異なり、本指針では具体的に明らかなでないことも少なくないので、個別に独立行政法人医薬品医療機器総合機構に相談することが望ましい。

(3) 本指針に記述された事項、試験方法、基準

表 3 ヒト(同種)iPS(様)細胞加工医薬品等の原材料となる体細胞の特性と適格性
——ドナーの選択基準, 適格性

<ul style="list-style-type: none"> ・年齢, 性別, 民族学的特徴, 病歴, 健康状態, 各種感染症に関する検査, 免疫適合性等の考慮 ・ドナー選択基準, 適格性基準の明確化と妥当性の説明 ・B型肝炎(HBV), C型肝炎(HCV), ヒト免疫不全ウイルス(HIV)感染症, 成人T細胞白血病, パルボウイルス B19 感染症の問診及び検査(血清学的試験や核酸増幅法等)により否定 ・必要に応じたサイトメガロウイルス, EBウイルス, 西ナイルウイルス検査 ・既往歴, 問診等より適格性を判断 <ul style="list-style-type: none"> ・梅毒トレポネーマ, クラミジア, 淋菌, 結核菌等の細菌による感染症 ・敗血症及びその疑い ・悪性腫瘍 ・重篤な代謝, 内分泌疾患 ・膠原病, 血液疾患, 肝疾患 ・伝達性海綿状脳症及びその疑い並びにその他の認知症 ・輸血, 移植医療を受けた経験の有無等も加味する

その他の技術要件は, それぞれの目的に合う内容と程度をもとに考慮, 選択, 適用, および評価されるべきことを意図しており, かならずしもつねに同一(最高)水準での解釈・運用を求めているわけではない。この趣旨を踏まえ, 申請者は考慮した背景, 選択, 適用, および評価した内容と程度がそれぞれの目的に相応しく, 科学的合理性からみて妥当であることを明らかにすること。

2. 自己由来iPS細胞加工製品と同種由来iPS細胞加工製品に対する技術要件の相違点

ヒト自己由来 iPS 細胞加工製品と同種由来 iPS 細胞加工製品に対する技術要件には共通点が多いが, 当然相違点もある。おもな点は, ①原材料となる細胞の由来, 適格性, ②免疫学的配慮, ③感染性物質検査, ④細胞バンクの樹立, ⑤最終産物のウイルス検査, などに関する技術要件である。表2および表3にこれらの点の一部の内容を示している。

「ヒト(自己・同種)iPS(様)細胞加工医薬品等の品質及び安全性の確保に関する指針案」の概略

1. 製造方法・品質面の留意点

指針案に記載されている製造方法および品質面での技術的要件のうち, とくに留意すべき事項は, ①各段階の細胞(原材料, 中間製品, 最終製品)の特性解析, 特性指標の把握, 適格性, ②その他の原材料, 製造関連物質の適格性と品質管理

(とくに生物由来物質, 複合製品の非細胞・組織成分など), ③微生物, とくにウイルス安全性, ④製造工程の妥当性, 一定性, ⑤目的細胞/純度/均質性/力価などの恒常的確保, ⑥安定性(貯法・有効期限設定, 凍結/解凍, 運搬する場合など), ⑦製品レベルと製法レベルでの適切な組合せによる品質管理などである。このうち, ①および③にかかわる自己由来 iPS 細胞と同種由来 iPS 細胞に対する技術要件の違いについては, すでに表2および表3に示したとおりである。

2. 非臨床安全性評価の留意点

非臨床安全性評価試験については, 貴重なヒト細胞製品を実験動物で試験することの限界を考慮したうえで, 製品の特性や適用法に応じ技術的に可能で, 科学的に合理的な範囲で実施することが肝要である。iPS 細胞加工医薬品等の場合, ①細胞(出発素材)の造腫瘍性, ②異所性の組織形成, ③不適切な分化/造腫瘍性, ④目的外の表現型発現にとくに留意すべきことはいうまでもない。また, ⑤同種の場合に免疫原性/免疫拒絶反応に対する留意も必要である。もし適切な製品モデル/疾患モデル動物があればこれらを合理的活用することも考慮する。基本的に重要なコンセプトは, 安全性評価は相対的なものであり, 細胞の種類・特性, 適用法, 適用量, 適用部位, 対象疾患, 施術者の専門性, 適切な安全性対策, 有効性, 臨床的意義などによって変わりうるということである。ケースバイケースであるが, 試験の意義を十分考

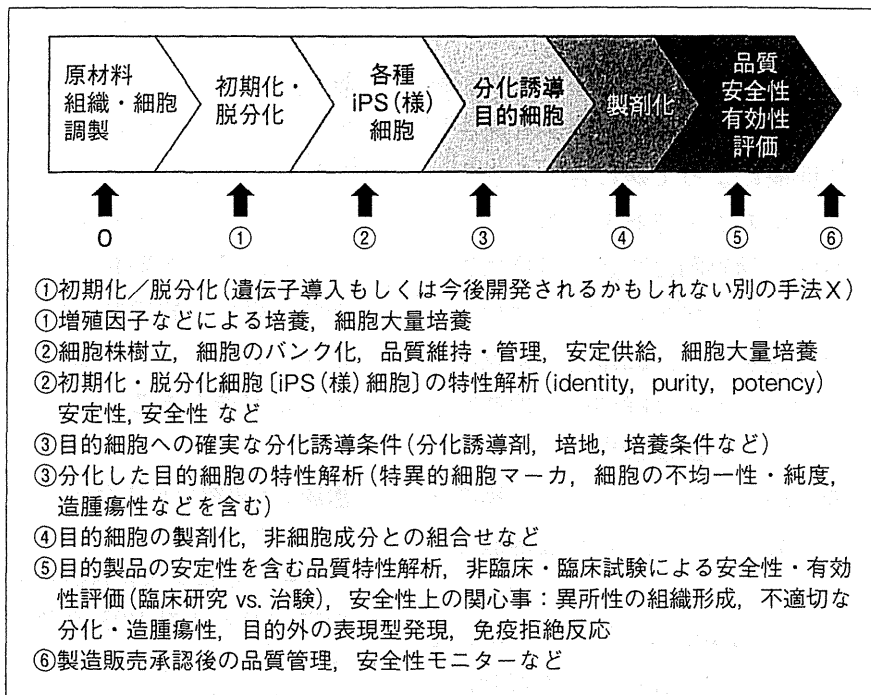


図 2 ヒトiPS(様)細胞加工医薬品等の製造, 評価のポイント

慮しながら実施することが望まれる。

3. 非臨床有効性評価の留意点

非臨床有効性評価についても技術的に可能で、科学的に合理的な範囲で実験動物や細胞などを用いて、期待される効果や体内動態などを検討することが肝要である。適切な製品モデル/疾患モデル動物の合理的活用も考慮する。既存の医薬品・医療機器や医療技術には期待できない治療効果が想定されるか、既存のものとは原理・手法において異なる治療法としての選択肢を提供するという意義が示されることが望まれる。想定される治療効果にインパクトがあれば、必要な安全性試験はそれとのバランスで考えられるかもしれない。

4. 臨床試験

臨床試験実施の詳細については両指針のテーマではない。しかし、非臨床レベルでの製品の品質・安全性の試験や評価上の留意点と臨床目的や実施計画などとはつねに双方向的に考え合わせる必要がある。国内の治験計画について評価する際には、①対象疾患、②対象とする被験者および被験者から除外すべき患者の考え方、③ヒトiPS(様)細胞加工医薬品等および併用薬の適用を含め、被験者に対して行われる治療内容(注:投与・移植した細胞の機能を維持・向上・発揮させるた

めに併用する薬剤が想定される場合、当該薬剤の作用を *in vitro* あるいは *in vivo* で検証すること)、④既存の治療法との比較を踏まえた臨床試験実施の妥当性、⑤現在得られている情報から想定される製品および患者のリスクおよびベネフィットを含め、被験者への説明事項の案、などの項目を踏まえることが必要とされている。その際、前述した1. 指針案の趣旨(2)項で示されている製品のリスクと“患者があらたな治療機会を失うことにより被るかもしれないリスク”とのリスクの大小を勘案し、かつ、これらすべての情報を開示したうえで患者の自己決定権に委ねるという視点を導入することが望まれている。

なお、臨床試験は適切な試験デザインおよびエンドポイントを設定して実施する必要がある、目的とする細胞・組織の由来、対象疾患および適用方法などを踏まえて適切に計画することとされている。

5. ヒトiPS(様)細胞加工医薬品等の製造, 評価のポイントのまとめ

図2にヒトiPS(様)細胞加工医薬品等の製造, 評価のポイントを改めてまとめた。

おわりに

本指針案を解釈し運用していくにあたって、前提と考えるべきことがある。本来の目的は再生医療というあらたな医療によって病に苦しむ患者が救われる機会を提供することである。指針の役割は、もっとも効率的・効果的に所定の目標に達するための要素と方策の提示である。指針にはさまざまな事態・状況を想定して、網羅的に留意事項が記述されているが、これらは細胞の特性や臨床目的、適用法などによって取捨選択されるべきものであり、また適用項目についても適切・柔軟に解釈・運用すべきものである。あらたな治療法への可能性が期待できること (proof of concept: POC), ヒトにはじめて適用してもさしつかえない程度に既存の知見のなかで想定しうる安全性上の問題がクリアされていること、倫理的妥当性の確保・堅持(ヘルシンキ宣言遵守, ドナー・患者に対する徹底的な説明と同意や自己決定権が前提)は当然であるが、手段である指針への遵守が主となり、他に代えられない患者への医療機会の提供という目標が従になるような解釈や運用は本末転倒であり、避けなければならない。

再生医療実用化の推進が、国民の保健衛生の維持・向上のための重要課題であることは自明の理である。革新的医薬品等や医療技術の開発は国民益にかなない国際益にもなる、人類共通の遺産の創出という平和的な国際貢献につながるからであ

る。ここにおける国の役割は、臨床研究や産業化推進のアシスト役であり、規制や指針はこうした共通のゴールに向かって科学的、合理的、効率的、効果的に進むための方策である。全関係者は同じピッチに立ち、ともにゴールに向かうプレイヤーであり、英知を結集してより早く患者のもとに画期的な細胞・組織加工医薬品等や革新的医療技術が届けられるよう、より高い達成度をめざして努力する必要がある。

謝辞：本研究は平成 20～22 年度および 23 年度厚生労働科学研究費補助金(医薬品・医療機器などレギュラトリーサイエンス総合研究事業)課題番号 H20-医薬-指定-028 および H23-医薬-指定-022) によるものである。本研究の分担(およびおもな協力)研究者は梅澤明弘 国立成育医療センター生殖医療研究部部長, 小澤敬也 自治医科大学医学部内科学講座血液学部門教授, 佐藤陽治 国立医薬品食品衛生研究所遺伝子細胞医薬部第 2 室長, 澤 芳樹 大阪大学大学院医学系研究科外科学講座教授, 松山晃文(財)先端医療振興財団再生医療研究開発部門部門長補佐, 山中伸弥 京都大学 iPS 細胞研究所長, 大和雅之 東京女子医科大学先端生命医科学研究所教授, 青井貴之 京都大学 iPS 細胞研究所教授である。

文献

- 1) 早川堯夫・他：再生医療, 9:116-180, 2010.
- 2) 早川堯夫・他：再生医療, 10:86-152, 2011.

* * *

安全性評価の総論，造腫瘍性試験の現状と展望

安田 智，佐藤陽治

国立医薬品食品衛生研究所

『幹細胞医療の実用化技術と産業展望』

2013年3月 ㈱シーエムシー出版刊 抜刷

第7章 品質評価

1 安全性評価の総論，造腫瘍性試験の現状と展望

安田 智^{*1}，佐藤陽治^{*2}

1.1 はじめに

細胞・組織加工製品を用いた再生医療は，治療法に乏しく，重篤・致死的ないしQOLを著しく損なう疾病・損傷に対して極めて有効な治療法になると期待されており，細胞・組織加工製品の開発は世界的にも熾烈な競争が展開している。その中で，ヒト由来の体性幹細胞，胚性幹細胞，さらには人工多能性幹細胞等の幹細胞を用いた製品の開発も盛んに進んでいる。難治性疾患等の患者にいち早く有効な再生医療を届けるためにも，国際的な再生医療の開発・ビジネス競争でわが国が主導的地位を得るためにも，将来の開発動向を見据えつつ，細胞・組織加工製品の品質・安全性に関して新規かつ汎用性の高い評価技術・製造法の開発を行い，わが国から世界に向けて先導的に提示していくとともに，より高品質で安全性及び有効性の高い製品の開発・実用化を国内で適正に推進することが急務である。本節では，幹細胞を用いた細胞・組織加工製品（幹細胞加工製品）の安全性評価に関して全般的に述べた後に，特にヒト多能性幹細胞加工製品において重要な品質管理上および安全性上の関心事である「造腫瘍性」に焦点を当て，製品中への造腫瘍性細胞の混入を検出する試験系の現状と展望について概説したい。

1.2 細胞・組織加工製品／幹細胞加工製品の安全性評価

細胞・組織加工製品の特性は，化学薬品やタンパク質性医薬品等とは著しく異なる。細胞・組織加工製品に特有の問題として，①形質は置かれる（微小）環境に依存する，②周囲の環境に対して薬理的・免疫学的・物理的に作用する，③長期培養により均一性が低下する場合がある，④脱分化・遊走の可能性がある，⑤壊れやすく寿命が有限である場合が多い，⑥高度な精製やウイルスの不活性化・除去が困難，ということが挙げられる。また，これらの問題の程度や重みは製品の種類により様々である。こうしたことから，細胞・組織加工製品の品質マネジメントの原則は，「リスク・ベース・アプローチ」とするのが妥当とされている。「リスク・ベース・アプローチ」とは，対象となる各製品に固有，かつその品質・安全性・有効性に関連するリスク要因を探

*1 Satoshi Yasuda 国立医薬品食品衛生研究所 遺伝子細胞医薬部 第2室 室長；先端医療振興財団 客員研究員

*2 Yoji Sato 国立医薬品食品衛生研究所 遺伝子細胞医薬部 部長；先端医療振興財団 客員研究員；名古屋市立大学 大学院薬学研究科 医薬品質保証学分野 客員教授

り当てることをベースにし、その影響の度合いを科学的に評価することにより品質確保の方針・内容をケース・バイ・ケースで柔軟に定めるアプローチ方法である。なお、ここで言うリスクとは、ある目的（有効性・安全性など）を達成する上での阻害要因を指す。細胞・組織加工製品の安全性面での主なリスクとしては、「ウイルス等の感染性因子の伝播」、「細胞の遺伝的不安定性と造腫瘍性」、「血清等の不純物混入」、「望まない免疫応答」、「非細胞成分による不必要な免疫応答、炎症反応、毒性」、「製品の意図しない生物応答」が挙げられ、製品開発においては、これらのリスクに対応した品質・安全性確保策が必要となる。特に、幹細胞は多分化能（multipotency）または多能性（pluripotency）と自己複製能という特徴を持ち、幹細胞を加工した製品は、加工内容や適用部位によっては、たとえ自己に由来するものであっても元来の細胞そのものではなく、また、存在していた、あるいは存在すべきであった（微小）環境とは異なる状態の下に臨床適用される可能性が高い。厚生労働省は、これらの点に留意し、各種幹細胞加工製品をより迅速に実用化するための品質・安全性確保に関する5つの指針を平成24年9月7日に発出した¹⁾。

冒頭に述べたように、細胞・組織加工製品／幹細胞加工製品は重篤・致命的ないしQOLを著しく損なう疾病・損傷を適用対象として開発される場合が多い。従って、これらの製品を治験・臨床研究でヒトに初めて使用する際には、明らかに想定される製品のリスクを現在の学問・技術を駆使して排除し、その科学的妥当性を明らかにしたうえで、なお残る「未知のリスク」と、重篤で生命を脅かす疾患、身体の機能を著しく損なう疾患、身体の機能や形態を一定程度損なうことによりQOLを著しく損なう疾患などに罹患し、従来の治療法では限界があり、克服できない患者が「新たな治療機会を失うことにより被るかも知れないリスク」とのリスクの大小を勘案し、かつ、これらすべての情報を開示した上で患者の自己決定権に委ねるという視点を持つこと、すなわち、リスク・期待されるベネフィットの情報を開示した上で、使用するかどうかの意思決定は患者が行うという視点を入れて評価することも重要である。

1.3 幹細胞加工製品の造腫瘍性試験

1.3.1 ヒト多能性幹細胞の造腫瘍性と造腫瘍性試験国際ガイドライン

「造腫瘍性」(tumorigenicity)とは、動物に移植された細胞集団が増殖することにより悪性または良性の腫瘍を形成する能力を言う。ヒトES細胞株やヒトiPS細胞株はテラトーマ(奇形腫)形成能、すなわち造腫瘍性を元来の特性として保持しており、この点がヒト体細胞・体性幹細胞とは大きく異なる。したがって、ヒト多能性幹細胞(ES/iPS細胞等)を原材料とした医薬品・医療機器においては、未分化細胞の混入・残留により異所性組織や腫瘍が形成される可能性があり、最終製品の造腫瘍性の評価と管理が重要な課題となる。

現在、細胞の造腫瘍性試験に関する国際的なガイドラインとして唯一存在するのは、世界保健機関(WHO)の生物薬品標準化専門委員会第47次報告(1998)(Technical Report Series No.878, TRS 878)にあるAnnex I「生物薬品製造用の*in vitro* 基材としての動物細胞の使用の要件」²⁾である。WHO TRS 878にある造腫瘍性試験の内容は、極めて大雑把に言えば、「ヌード

マウス等の動物 10 匹に 10^7 個の細胞を投与して 16 週間観察し、陽性対照としては Hela 細胞などを用いる」というものであるが、注意しなければならないのはその適用対象と目的である。

WHO TRS 878 の造腫瘍性試験の適用対象は、あくまでワクチンやタンパク質製剤など、ヒトを対象に *in vivo* 又は *ex vivo* で投与される生物薬品を製造する際に *in vitro* 基材として用いられるヒト又は動物由来の細胞株である。「患者に移植する細胞」および「治療を目的に患者に移植する細胞株の原料となる細胞」は、WHO TRS 878 の対象外とされており、その特性解析においては規制当局等との議論が必要とされている。

WHO TRS 878 における造腫瘍性試験の目的は、生物薬品用細胞基材となる細胞株の均一なバンク（セル・バンク）の造腫瘍性の程度又は有無を正確に把握することにある。造腫瘍性の程度の大幅な変化又はその有無に変化が生じた場合、細胞特性に何らかの異常が起こったという指標となる。つまり、既知あるいは未知のウイルス感染、変異原性物質やストレスによる遺伝子変異・発がん遺伝子活性化など、原因はいずれにせよ、セル・バンクの安定性上の異常が発生したことを検出するための方策として、セル・バンクの造腫瘍性を細胞特性指標の一つとして評価し、品質管理に活用することが必要とされるわけである。

1.3.2 ヒト多能性幹細胞加工製品の造腫瘍性試験

ヒト多能性幹細胞加工製品についての造腫瘍性試験には、目的別に以下の 3 種類があり得る。①原材料の品質管理のための造腫瘍性試験、②製造工程管理のための造腫瘍性試験、③最終製品の安全性評価のための造腫瘍性試験、である。以下にこれら 3 種の造腫瘍性試験の特徴と方法について述べる。

(1) 原材料（細胞基材）の品質管理のための造腫瘍性試験

ヒト多能性幹細胞加工製品の原材料は、文字通り、ヒト ES 細胞株やヒト iPS 細胞株等である。これらはヒト多能性幹細胞加工製品という生物製剤の一種を製造するための細胞基材である。従って、これらにおける「造腫瘍性」とは、すなわち生物製剤の原材料（細胞基材）の品質特性のひとつと捉えることが出来る。

ヒト多能性幹細胞加工製品の原材料としてのヒト多能性幹細胞バンクの造腫瘍性における懸念事項は、WHO TRS 878 におけるセル・バンクの品質管理の考え方と同様に、「セル・バンクの造腫瘍性が既定の範囲内にあるか？」ということになる。ヒト多能性幹細胞加工製品の原材料としてのヒト多能性幹細胞バンクの造腫瘍性の意味づけは WHO TRS 878 における細胞基材の造腫瘍性の意味づけとほぼ同じであることから、その評価方法についても、WHO TRS 878 の方法を準用することが可能であると考えられる。

(2) 製造工程（中間製品）管理のための造腫瘍性試験

ヒト多能性幹細胞加工製品の中間製品となる細胞集団には、目的細胞ないしその前駆細胞に加え残存多能性幹細胞およびその他の目的外細胞が含まれている可能性がある。中間製品の造腫瘍性試験における「造腫瘍性」とは、製造工程管理のための指標としての意味合いがある。製造工程管理における造腫瘍性関連の懸念事項には、「どのくらいヒト多能性幹細胞が残存しているか」

ということと「目的外細胞として造腫瘍性形質転換細胞が含まれているか」という2点がある。

中間製品の中に「どのくらいヒト多能性幹細胞が残存しているか」ということに関しては、多能性幹細胞のマーカ遺伝子／マーカタンパク質を利用した方法により評価することが可能である。手技としては定量 RT-PCR やフローサイトメトリーなどが挙げられる。

中間製品の中に「目的外細胞として造腫瘍性形質転換細胞が含まれているか」ということを評価するための方法としては、例えば細胞増殖特性の評価（不死化細胞の検出）や軟寒天コロニー形成試験（足場非依存性増殖細胞の検出、後述）が挙げられる。造腫瘍性形質転換細胞の検出に *in vivo* 造腫瘍性試験系を活用することも考えられるが、最終製品（ないし中間製品）の中に含まれる僅かな造腫瘍性細胞を検出する必要があるため、WHO TRS 878 の方法よりも十分に低い検出限界を備えている必要がある。検出限界の低い試験系としては、T細胞、B細胞およびNK細胞を欠失した NOD/SCID/ γ Cnull (NOG) など、ヌードマウスよりも免疫力の低下した重度免疫不全マウスシステムを利用することが考えられる^{3, 4)}。ただし新規動物モデルを用いた科学的リスク評価のためには、細胞・組織加工製品の造腫瘍性の定量化方法の検討と、その標準化が必要である。

(3) 最終製品の安全性評価のための造腫瘍性試験

ヒト多能性幹細胞加工製品の最終製品中の細胞集団、すなわち「投与細胞」には、目的細胞に加え、混入する前駆細胞や残存多能性幹細胞およびその他の目的外細胞が含まれている可能性がある。また、最終製品の造腫瘍性試験における「造腫瘍性」には、ヒトでの生着部位での腫瘍形成能を考察する材料であることが要求される。すなわち、最終製品における造腫瘍性関連の懸念事項には、「どのくらいヒト多能性幹細胞が残存しているか」ということと「目的外細胞として造腫瘍性形質転換細胞が含まれているか」ということに加え、「投与細胞が、生着する微小環境で腫瘍を形成するか」ということが挙げられる。

最終製品の中に「どのくらいヒト多能性幹細胞が残存しているか」「目的外細胞として造腫瘍性形質転換細胞が含まれているか」ということに関しては、多能性幹細胞のマーカ遺伝子／マーカタンパク質の検出、細胞増殖特性の評価、軟寒天コロニー形成試験などで評価できる可能性がある。

一方、「投与細胞が、生着する微小環境で腫瘍を形成するか」という懸念については、*in vivo* 造腫瘍性試験が必要となる。その場合に考慮すべき点としては、①試験系の検出限界、②投与細胞数、③投与部位などが挙げられる。投与部位については可能ならばヒトでの投与部位に相当する部位を選択すべきである。もしも、物理学的障害を生ずるなどの理由により当該部位に対する投与細胞数に限界がある場合には、可能であれば投与部位を変更するのではなく、動物とヒトとの間の当該投与部位の相対的スケール比に応じて投与細胞数を調節する。すなわち、生着する微小環境と投与細胞との相互作用による腫瘍形成の可能性を考察することを優先する。免疫特権、炎症、虚血など、特殊な投与環境における細胞の挙動は動物モデルにおける *in vivo* での評価でなければ、考察することが困難だからである。

1.3.3 造腫瘍性関連 *in vitro* 試験

細胞集団の造腫瘍性、あるいは細胞集団中の造腫瘍性細胞を検出する系としていくつかの *in vitro* 試験系があるが、それぞれに長所と短所がある。それらを *in vivo* 試験法と併せて表1にまとめた。核型分析などの染色体異常を検出することを目的とする試験は技術的に確立されているものの、得られた結果と細胞の造腫瘍性との相関性が低いことが多く、最終製品の造腫瘍性を評価するというよりも、原材料の品質または製造過程における製品の遺伝的安定性を評価するという目的で実施されるべきものと言える。軟寒天コロニー形成試験は、がん細胞の多くが足場非依存的に増殖するのに対して接着性正常細胞は足場が存在しないとアポトーシス（アノキス）を起こすという性質を生かした試験系で、細胞を分散して軟寒天に封入し、足場非依存的な細胞増殖を検出する試験である。ただし、ヒト ES 細胞やヒト iPS 細胞はトリプシン処理などによる分散によってアポトーシスを起こす特異な性質を持つことが知られており、ヒト多能性幹細胞加工製品の場合、単純には軟寒天コロニー形成試験を適用できない。我々は、分散誘導性アポトーシスを抑制すると言われる ROCK 阻害剤存在下にヒト iPS 細胞を分散、軟寒天中に播種した経験があるが、それでもコロニー形成は認められなかった⁵⁾。フローサイトメトリーや定量 RT-PCR は、特定のマーカータンパク質・マーカー遺伝子の発現を指標に未分化細胞または造腫瘍性細胞を短時間で検出する簡便な系で、フローサイトメトリーの場合は細胞を分離・回収出来る点、定量 RT-PCR はその高い感度が利点である。我々は、初代培養ヒト体細胞中にヒト iPS 細胞を添加して検討した結果、フローサイトメトリーでは 0.1%、定量 RT-PCR の場合には 0.002% の存在比のヒト iPS 細胞を有意に検出することができることを明らかにしている⁵⁾。不死化細胞を *in vitro* で検出する系としては、所定の培養期間を超えて細胞を培養し、その増殖特性を解析する試験がある。これらを組み合わせて未分化細胞および不死化細胞の存在を否定できれば、最終製品の造腫瘍性はかなり低いことが示唆されるが、臨床試験に進むことの妥当性は、投与細胞数、投与部位、リスクマネジメントプラン、あるいは *in vivo* 造腫瘍性試験データ等によって製品ごとに判断されるべきだと考えられる。

1.3.4 ヒト体細胞・体性幹細胞加工製品の造腫瘍性試験

加工されていないヒト体細胞・体性幹細胞を使った移植医療の現場では造腫瘍性試験がほとんど行われていないことから明らかなように、ヒト体細胞・体性幹細胞加工製品の原材料となる体細胞・体性幹細胞には、造腫瘍性がないと一般的に考えられている。従って、ヒト体細胞・体性幹細胞加工製品の造腫瘍性に関しては、「加工後の最終製品中に目的外細胞として造腫瘍性形質転換細胞が混入しているか」という懸念と「投与細胞が、生着する微小環境において腫瘍を形成するか」という懸念についてのみ検討すればよいということになる。

特に、製品中の細胞がドナーでの基本機能と同様の基本機能を示すことを期待して製品を使用（「相同的使用」(homologous use) という）する場合には、「最終製品中に目的外細胞として造腫瘍性形質転換細胞が混入しているか」ということが適切な試験（細胞増殖特性解析等）により十分に否定できれば、造腫瘍性については移植医療と同レベルと考えられ、それ以上の検討は必

表1 主な造腫瘍性関連試験の能力と限界

in vivo 試験法				
試験法	測定事項	目的	利点	欠点
ヌードマウスへの移植	腫瘍形成	造腫瘍性細胞の検出	● 定量化の方策が整備 (WHO TRS 878)	● 時間 (数週間～数カ月)・費用がかかる ● 膵がん、乳がん、グリア細胞腫、リンパ腫、白血病細胞に由来する細胞株は腫瘍を形成しない ● 僅かに含まれる造腫瘍性細胞を検出できない
NOD-SCID マウスへの移植			● ヌードマウスよりも高感度	● 時間 (数週間～数カ月)・費用がかかる ● 定量化の方策が未整備 ● 胸腺腫を自然発症
NOG/NSG マウスへの移植			● NOD-SCID よりも高感度/胸腺腫なし	● 時間 (数週間～数カ月)・費用がかかる ● 定量化の方策が未整備
in vitro 試験法				
試験法	測定事項	目的	利点	欠点
細胞増殖特性解析 (所定培養期間を 超えた培養)	細胞増殖速度	不死化細胞 の検出	● 簡便・安価 ● 時にはヌードマウスよりも「高感度」 (不死化していても腫瘍形成のないケース)	● 僅かな不死化細胞の混入の検出には 時間がかかる
フローサイトメトリー	細胞マーカー 蛋白質発現	造腫瘍性 細胞・未分化 細胞の検出	● 短時間 (～1日)・簡便 ● 時には軟寒天コロニー試験よりも「高感度」 ● 細胞を識別・分離・回収できる	● 特定のマーカー発現細胞だけしか検出できない =マーカー(-)の造腫瘍性細胞を見逃すおそれ ● ゲートの掛け方で結果がばらつく
qRT-PCR	細胞マーカー 遺伝子発現		● 短時間 (～1日)・簡便 ● 時にはフローサイトメトリーよりも「高感度」	● 特定のマーカー発現細胞だけしか検出できない =マーカー(-)の造腫瘍性細胞を見逃すおそれ
軟寒天コロニー形成試験	コロニー形成	足場非依存的 増殖の検出	● in vivo 試験より短時間(数週間～1カ月程度) ● 安価 ● 時にはヌードマウスよりも「高感度」	● 浮遊系細胞に使用できない ● 僅かに含まれる造腫瘍性細胞を検出できない ● ヒト ES/iPS 細胞は検出不能(分散誘導性細胞死)
核型分析	染色体の数・ サイズ・形	染色体異常 の検出	● 技術的に確立	● 相関性の問題 (染色体異常⇔造腫瘍性) ● 僅かに含まれる造腫瘍性細胞を検出できない
染色体 CGH および アレイ CGH	ゲノム DNA の コピー数異常			
蛍光 in situ ハイブリ ダイゼーション(FISH)分析	特定遺伝子の 位置・コピー数			

表2 米国・EUで承認済みのヒト細胞・組織加工製品の造腫瘍性関連試験（それぞれの審査概要から抽出・整理）

	製品名	細胞/足場材料	適用	造腫瘍性試験			核型分析	免疫不全動物を用いた他の試験(動物)	備考
				<i>in vivo</i> (動物)	軟寒天コロニー形成試験	細胞増殖特性解析			
米国	Carticel	自己軟骨細胞	軟骨損傷						
	Provenge	自己樹状細胞 (PAP 抗原提示)	転移性 前立腺がん						「自己由来製品なので」 非臨床安全性試験なし
	laViv (azficel-T)	自己線維芽細胞	ほうれい線 解消 (美容整形)						「ヒトでの経験が豊富な ので」非臨床試験なし。なお 臨床試験中に腫瘍形成1例
	HemaCord (HPC-C)	同種臍帯血由来 造血前駆細胞	造血幹細胞 移植			○			Colony forming unit 測定
	Epicel	自己角化細胞/ マウス細胞層	熱傷	○ (ヌードマウス)	○		○	○ (ヌードマウス)	ヌードマウス・軟寒天 ともに陰性
	Apligraf (Graftskin)	同種角化細胞+ 同種線維芽細胞/ ウシ由来コラーゲン	皮膚潰瘍	○ (ヌードマウス)			○	○ (hu-SCID マウス)	マスターセルバンクが ヌードマウスで陰性
	Gintuit (Apligraf (Oral))	同種角化細胞/ ウシ由来コラーゲン	口腔軟組織 再生	○ (ヌードマウス)					マスターセルバンクが ヌードマウスで陰性
	TransCyte (Dermagraft-TC)	同種線維芽細胞/ ナイロン基材	熱傷		○			○ (ヌードマウス)	軟寒天で陰性
	Dermagraft	同種線維芽細胞/ ポリグラクチンメッシュ	皮膚潰瘍	○ (ヌードマウス)			○	○ (ヌードマウス)	ヌードマウスで陰性
	OrCel	同種角化細胞+ 同種線維芽細胞/ ウシ由来コラーゲン	熱傷 表皮水疱症					○ (SCID マウス, ヌードマウス)	
EU	ChondroCelect	自己軟骨細胞	軟骨損傷			○	○ (ヌードマウス)	既定期間を越えた培養で 細胞老化確認	

要ないと考えられる。

表2に欧米において薬事承認済みのヒト細胞・組織加工製品（すべてヒト体細胞加工製品）を示すと同時に、各製品の審査概要に記載されている造腫瘍性関連試験の内容を示す。ヌードマウスを用いた *in vivo* 造腫瘍性試験を実施している製品が4件ある。これらの試験では少量の造腫瘍性細胞が混入している場合でも結果はすべて偽陰性になってしまう可能性が高い。もちろん、結果が陰性であることにより、造腫瘍性の高い細胞が極端に大量（数十％程度）には混入していないことを確認することはできるが、それほどの混入ならば、より簡単で安価な細胞増殖特性解析で何らかの明らかな異常が認められるはずである。

ヒト体細胞・体性幹細胞加工製品は相同時の使用、非相同時の使用ともに、世界各地で臨床応用が進んでいるが、製品の投与を原因とする腫瘍形成の報告はほとんど存在せず、これまでに科学論文として報告されたものは、ヒト胎児由来神経幹細胞を用いた毛細血管拡張性運動失調症の治療により脳腫瘍が形成されたとするもの1件しかない⁶⁾。筆者らの知るところでは、ヒト成人由来体細胞・体性幹細胞の投与による腫瘍形成の報告はない。過去にヒト間葉系幹細胞の *in vitro* 培養時の自発的な悪性形質転換が4件報告されているが、このうち2件^{7, 8)} はがん細胞株のクロスコンタミネーションによるものであることが後に判明している。また、残りの2件^{9, 10)} では *in vitro* 培養時に細胞の不死化が検出されている。これらのことは、GMPによる最終製品への悪性腫瘍細胞のクロスコンタミネーション防止が重要であること、および細胞増殖特性の把握が重要であることを示している。したがって、GMPに準拠して培養・加工され、細胞増殖特性解析で異常がないことを確認した成人由来のヒト体細胞・体性幹細胞の移植については、非臨床安全性試験としての *in vivo* 造腫瘍性試験を行う必要性は高くないと考えられる。

1.3.5 造腫瘍性試験に関するまとめ

ヒト多能性幹細胞加工製品を含む細胞・組織加工製品を対象にした造腫瘍性試験ガイドラインは今のところ存在しない。WHO TRS 878の造腫瘍性試験は対象・目的が異なるため、細胞・組織加工製品の造腫瘍性評価にそのまま転用することには無理がある。解決策としては、重度免疫不全マウスの利用が考えられ、重度免疫不全マウスを用いた造腫瘍性の定量的評価法の開発と標準化が目下の課題である。造腫瘍性関連試験には *in vitro* の試験系もあり、各試験系の能力と限界を科学的に踏まえ、個別の製品で示すべき具体的な評価事項に適用かどうかで取捨選択する必要がある。

文 献

- 1) 薬食発 0907 第2号, 第3号, 第4号, 第5号, 第6号, 厚生労働省医薬食品局長通知別添
- 2) http://www.who.int/biologicals/Cell_Substrates_clean_version_18_April.pdf

- 3) M. Ito *et al.*, *Blood*, **100**, 3175 (2002)
- 4) K. Machida *et al.*, *J. Toxicol. Sci.*, **34**, 123 (2009)
- 5) T. Kuroda *et al.*, *PLoS One*, **7**, e37342 (2012)
- 6) N. Amariglio *et al.*, *PLoS Med.*, **6**, e1000029 (2009)
- 7) D. Rubio *et al.*, *Cancer Res.*, **65**, 3035 (2005)
- 8) G.V. Røslund *et al.*, *Cancer Res.*, **69**, 5331 (2009)
- 9) Y. Wang *et al.*, *Cytotherapy*, **7**, 509 (2005)
- 10) D.Q. Tang *et al.*, *Am. J. Stem. Cells.*, **1**, 114 (2012)